

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670582

研究課題名(和文) 内在性レトロウイルスの制御に関する研究

研究課題名(英文) Study for the knockout of porcine endothelial retrovirus (PERV)

研究代表者

宮川 周士 (Miyagawa, Shuji)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90273648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPRシステムによるPERVのknockoutを試みた。PERV遺伝子のgagおよびpolの領域においてknockout効率の高いターゲット配列(gRNA)をそれぞれ1か所ずつ選定し、pX330 = U6-gRNA+Cas9+neomycinを作製した。次に、gag領域をターゲットとしたplasmidを、PK15細胞にtransfectionし、neomycinによるselection後、17個のクローンを得た。Integrateされているクローンは15個に絞られた。さらにこれらクローンのgag-KO領域をダイレクトシーケンシングした結果、1個のクローンのgag領域に変異を確認できた。

研究成果の概要(英文)：We attempted to knockout the PERV by CRISPR system. The plasmids expressing hCas9 and sgRNA for PERV were prepared by ligating oligos into pX330. pCAG-EGFP-target was mixed with pX330 with/without sgRNA sequences and then introduced into HEK293T cells. The EGFP fluorescence was then observed after transfection. Four oligos and primers are nominated in each gag and pol region from 38 and 20 candidates, respectively. Among them, the best one of each region was selected. Next, the expression of the PERV can be knocked out by CRISPR system. PK15 was used to check the changes in the expression of PERV by the pX330-gag with neomycin. After the transfection of the pX330, 17 clones of PK15 cells with the pX330 were established by neomycin selection. Among them, 15 clones were ascertained the integration of pX330-gag into the genome. The sequence of the 15 clones was then checked. A clone showed certain delation of the targeting site of PERV by the CRISPR system.

研究分野：移植免疫

キーワード：ブタ内在性レトロウイルス(PERV s) CRISPR/CRシステム OFF Targetting効果 Gag-pol

1. 研究開始当初の背景

バイオ臓器の研究は、我々の異種移植における拒絶反応のメカニズムの報告<Transplantation 1988;46:825-830>がきっかけとなり活発となった。その後1990年代にはトランスジェニックブタの開発競争が盛んになったが、1997年に in vitro でヒトの細胞がブタ内在性レトロウイルス (PERV) に感染する事が分かり、大きな問題になっている。これに対して、2000年頃より学会が調査に乗り出し、過去一人の感染者も、感染動物(サル)も出ていない事が判明し、現在では研究者=学会側は安全であるとしている。従って、ニュージーランド等の国では既に国会の承認を得て、バイオ・ブタ臍島細胞移植が臨床で行なわれている。しかし、アメリカ=FDAは、PERVs に対してかなり慎重な態度を崩していない。保守的な国民感情の日本では、アメリカや独、英、仏で始まらないとなかなか受け入れられない事が予想されている。

我々はこの間、PERVの制御法の研究を行ってきた。まずはRNA干渉法で、世界に先駆けて PERVs の制御に成功している<J Biol 2005;137:503-508>。つぎに、糖鎖工学的アプローチとして、PERVリガンドのN型糖鎖、特に high mannose 型の感染の際の重要性を報告<Xenotransplantation 2006;13:258-263>。

それに伴い、N型糖鎖の初期合成酵素 Do1-P-Mannosidase (D-P-Man) をブタで cloning し、knockdown(KD)を加える事により PERV の感染の制御の可能性を検証した。<Transplant Int 2010;23:424-31>。他には、コッホ研究所で積極的に PERVs 研究がなされている。

一方、ブタではES細胞が開発されていないため、遺伝子に knockout (KO) 操作をかける事は極めて困難であった。しかし、近年 Zinc-finger Nuclease (ZFN) や Transcription Activator-Like Effectors (TALEs) 法の開発により、比較的容易に KO ができる様になった。

さらに、CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) /CS (Cas9) システムが報告された。

2. 研究の目的

1997年 in vitro でヒトの細胞がブタレトロウイルス (PERV) に感染する事が判明し大きな問題になった。これに対して現在では学会側は安全であるとしている。既に一部では臨床でバイオ・ブタ臍島細胞移植が行なわれている。我々はこの間、PERV の制御法の研究 (RNA 干渉法、糖鎖工学的に感染制御の可能性を検証) を行ってきた。今回、遺伝子工学の発達により報告された CRISPR/CS システムで PERVs を Knockout (KO) するのが目的である。まずは、ブタゲノムの一部と CHO 細胞を使って GFP-KO システムで KO 部位を選定し、PERV 感染 の検査システムを使い KO 状態を検定する。次に、我々が開発した Gal-KO 繊維芽細胞にこれを導入し、核移植用の PERVs-free のブタ繊維芽細胞を樹立する。

3. 研究の方法

I. CRISPR/CS の設計。

①報告されている PERV の sequence を比較して、gag あるいは pol の重要部分を中心に KO 位置を数カ所選定する。この際、Off targeting 効果が出ない様に、ブタ genome の data base と十分比べあわせ、可能性の少ない部分を選び出す。

②次に、この10カ所に CRISPR/CS を設計し、GFP-KO システムで効率を検定する。

各ノミネート箇所の前後約 500bp をあらかじめ pCAG-EGFP Vector に組み込み、これをターゲットに使い、これと同時に設計箇所 = (G(N19)NGG を組み込んで遺伝子導入する。
* 目的とする遺伝子が KO されると、細胞が Green に光るシステムである。

* mRNA ではなく、vector=plasmid のまま遺伝子導入する方法を取る。これにより、KO し易い部分が判明する。

II. <検定 1=感染実験>

次に、PK15等のPERV高発現細胞を用いて、選定部位のKOによるヒトへの感染性の変化を検討する。

ウイルス産生細胞には、PK15あるいはLacZ遺伝子を導入しPERV-Bを強発現させたPEC (Lac Z) /PERV-Bを、標的細胞には、ヒト胎児腎細胞株である293細胞を用いる。

このPK15あるいはPEC (Lac Z) /PERV-BにCRISPH/CSでKOをかけ、まず効率の良い部位を割り出す。次に、少なくとも一カ所で全PREVをKOで切る部位を選別する必要があり、無理なら数カ所同時にKOをかける事も考える。

<検定 2.>Sequence & RT 活性

さらに効率の良い部位を複数カ所(2カ所)選定出来たら、このCRISPH/CSと薬剤選択遺伝子(PuroかNeo)を同時に、PK15あるいはPEC (Lac Z) /PERV-Bに導入し、PERV放出が無くなった細胞をcloningし、lineとする。SequenceやRT活性、RT-PCRでKOされているか検定する。

4. 研究成果

報告されているPERVのsequenceを比較して、gagの重要部分を中心にCRISPH/CSのKO位置を計38カ所選定した。つぎに、Off targeting効果が出ない様に、ブタgenomeのdata baseと十分比べあわせ、可能性の少ない部分を前半4カ所選び出し得たが、後半は0カ所であった。

つぎに、pol領域を調べた。同じく20カ所選定し、Off targeting効果が出にくい部位を4カ所選んだ。

Gag-polのそれぞれの部位の前後約500bpをあらかじめpCAG-EGxxFP Vectorに組み込みこんだ。そして、これをターゲットに使い、これと同時にそれぞれの設計箇所=(G(N19)NGGを組み込んだpX330=U6-(G(N19)NGG)+CBh-NLS+hSpCas9+NLS+polyA)を作製し、これらをHEK293T細胞(ヒト細胞)へ遺伝子導入した。この結果、もともと効率よ

くGag-polの部分の遺伝子を切り、GFPがよく光った箇所を、効率の良い箇所とし、gagで1カ所、polで1カ所選定で得た。加えて、この2カ所のOff targeting効果は、両方ともN11、N12、N13とも11であった。

これと同時に、ヒト細胞のPREV感染の有無を検定するPCRの条件を設定し得た。また、PERV LacZ assayのためのPEC/LacZ(B)細胞、HEC293細胞を用意した。

つぎに、それらの配列を用いて、実際にPERVをKOしたブタ細胞の樹立を試みた。まず、細胞樹立のために薬剤選択マーカーneomycin耐性遺伝子を組み入れたpX330 = U6-gRNA+Cas9+neomycinの作製に取り組んだ。Neomycin耐性遺伝子を組み入れたpX330(既存のもの)と、選定したgRNAが組み込まれたpX330(昨年度作製)の2つのplasmidを用意し、それらを制限酵素SacIIとXbaIで処理した。

Vector側、insert側をゲル抽出によって採取し、それらをligationし、pX330 = U6-gRNA+Cas9+neomycinが完成した。

次にこのうちgag領域をターゲットとしたplasmidを制限酵素NotIでリニアライズし、PK15細胞(ブタ腎臓細胞)にLipofection法でtransfectionした。Transfectionした細胞は、neomycinによるselection後、限界希釈によってクローニングを行った。計17個のクローンが得られた。それら全てについてPCRでneomycin配列(約1070bp)がゲノムにintegrateされているかどうか調べた。結果、integrateされているクローンは15個に絞られた。これらはgRNAおよびCas9も含めて安定に発現していると考えられた。さらにこれらクローンのgag-KO領域をダイレクトシーケンシングした結果、1個のクローンのgag領域に変異を確認することができた

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

〔雑誌論文〕

* Rieko Sakai, Yoko Esaki, Hidetoshi
Hasuwa, Masahiko Ikawa, Pei-chi Lo, Rei
Matsuura, Kengo Nakahata, Masahiro
Zenitani, Mayumi Asada, Akira Maeda,
Hiroshi Eguchi, Hiroomi Okuyama and Shuji
Miyagawa.

Knockout of cytidine monophospho-N-
acetylneuraminic acid (CMP-NeuAc)
hydroxylase from porcine endothelial
cells by a CRISPR system. Transplant
Proc. 2016

〔学会発表〕(計2件)

*日本異種移植研究会(18)、長崎大学 2015 2
月 20 日

ブタ内在性レトロウイルス (PERV) ノックア
ウトにおける CRISPR 法の有効性

○坂井理恵子、羅 颯、蓮輪英毅、松浦 玲、
中畠賢吾、山中和明、前田 晃、江口 寛、浅田
麻友美、伊川正人、長嶋比呂志、奥山宏臣、宮
川周士

*日本外科学会 (116) 大阪、2016 年 4 月 14-
16 日

CRISPR 法によるブタ内在性レトロウイルス
(PERV) の制御の試み

○宮川周士、坂井理恵子、LO PEI CHI、蓮輪
英毅、松浦 玲、中畠賢吾、山中和明、前田 晃、
江口寛、浅田麻友美、伊川正人、長嶋比呂志、
奥山宏臣

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 周士 (Shuji Miyagawa)

大阪大学大学院 医学系研究科 准教授

研究者番号 : 90273648